

胃康灵胶囊中化学成分在人和大鼠肠道菌群中的代谢比较

刘峰¹, 曲文华², 彭颖¹, 于涵川¹, 李晓波^{1*}

(1. 上海交通大学, 上海 200240; 2. 黑龙江葵花药业股份有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: **目的** 比较胃康灵胶囊中化学成分在人和大鼠肠道菌群中的代谢。**方法** 将胃康灵胶囊与人、大鼠肠道菌液分别在 37 °C 厌氧环境中孵育, 于 0、1、3、6、12、24、48 h 取样处理, 采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 通过对照品、二级质谱图对胃康灵胶囊中化学成分进行鉴定, 并推测其代谢途径。**结果** 胃康灵胶囊经人和大鼠肠道菌群代谢后, 共检测出 15 种原型成分, 包括单萜苷类、黄酮苷及其苷元类、三萜苷及其苷元类、小分子酸苷类, 在肠道菌作用下, 它们主要发生脱糖基反应, 并伴随重排、加氢和脱甲基等。胃康灵胶囊在人、正常大鼠肠道菌液中的代谢产物相同, 单萜苷类、黄酮苷元类、小分子酸苷类成分和甘草酸的代谢速率主要表现为正常大鼠>人, 黄酮苷类成分和甘草次酸的代谢速率主要表现为人>正常大鼠; 单萜苷类成分的代谢速率主要表现为正常大鼠>胃炎大鼠, 其他成分均表现为胃炎大鼠>正常大鼠。**结论** 胃康灵胶囊中化学成分能在人和大鼠肠道菌群中发生代谢, 其速率与病理状态有关。

关键词: 胃康灵胶囊; 人源肠道菌群; 鼠源肠道菌群; 化学成分; 代谢; UHPLC-Q-TOF-MS/MS

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)01-0238-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.01.041

胃康灵胶囊由白芍、白及、三七、甘草、茯苓、延胡索、海螵蛸、颠茄浸膏组成, 具有柔肝和胃、散瘀止血、缓急止痛的功效^[1], 临床主要用于治疗慢性胃炎、胃溃疡等胃肠道疾病。课题组前期采用超高效液相色谱四极杆飞行时间串联质谱 (UHPLC-Q-TOF-MS/MS) 法对胃康灵胶囊进行化学成分分析, 发现白芍的单萜苷类、甘草的黄酮及其苷类、甘草和三七的皂苷类、延胡索的生物碱类、白及的小分子酸苷类是其主要化学成分^[2]。

中药多为口服给药, 口服后的中药成分在肠道内会受到肠道菌群代谢, 从而引起活性成分生物利用度及其药理活性的改变^[3-4]。如甘草酸水溶性较大, 生物利用度比较低, 但是在肠道菌群的作用下可被代谢为甘草次酸, 脂溶性增加, 抗肝毒性作用更好^[5-7]。因此, 为全面探究胃康灵胶囊中的化学成分在肠道中的吸收代谢情况, 本研究将胃康灵胶囊进行离体人肠道菌群试验, 明确其所含成分在肠道中生物转化的一般规律, 从而揭示胃康灵胶囊中的化学成分在肠道中的代谢机制。此外, 由于药物的吸收易受动物种属差异和病理状态的影响^[8-9], 本研究还分别比较人与正常大鼠、正常大鼠与胃炎大鼠肠道菌群的代谢差异, 以期对胃康灵胶囊的体内药效物质基础研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物 12 只清洁级雄性 SD 大鼠, 体质量 (160±20) g,

购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产合格证号 SCXK (沪) 2017-0005。所有动物实验均按照《实验动物的护理和使用指南》进行^[10], 并经上海交通大学动物伦理委员会批准, 实验动物使用许可证号 SYXK (沪) 2018-0028, 动物批准文号为 A2019073。大鼠饲养于上海交通大学动物实验中心, 温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h/12 h 日夜循环, 喂食正常维持饲料, 自由饮水。

1.2 试剂与药物 胃康灵胶囊 (批号 201908012) 由黑龙江葵花药业股份有限公司提供。甘草苷 (批号 DST181127-009)、异甘草苷 (批号 DST180314-015)、芹糖甘草苷 (批号 DST180306-139)、芹糖异甘草苷 (批号 DST190102-106)、芒柄花苷 (批号 DST190114-044)、异甘草素 (批号 DST190102-166)、甘草素 (批号 DSTDG001001)、芒柄花素 (批号 DST180908-006)、甘草酸 (批号 DST 180906-008)、甘草次酸 (DST180314-007)、芍药苷 (批号 DST190303-070)、氧化芍药苷 (批号 DST180429-080)、芍药内酯苷 (批号 DST180419-071)、militarine (批号 DST190724-025) 对照品均购自成都德思特生物技术有限公司, 纯度≥98%; dactylorhin A (批号 PRF20031304) 对照品购自成都普瑞法科技开发有限公司, 纯度≥98%; 胃蛋白酶试剂盒、BCA 蛋白浓度测试试剂盒均购自南京建成生

收稿日期: 2022-07-18

基金项目: 国家重点研发计划-中成药整体性质量控制技术研究项目 (2018YFC1707304)

作者简介: 刘峰 (1991—), 女, 博士生, 研究方向为中药药效物质及其质量标准。Tel: (021) 34204802, E-mail: liufeng163lf@163.com

* 通信作者: 李晓波 (1963—), 女, 教授, 研究方向为中药药效物质及其质量标准。Tel: (021) 34204806, E-mail: xbli@sytu.edu.cn

网络出版日期: 2022-11-24

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20221122.1722.004.html>

物工程研究所；苏木精-伊红染色（HE染色）试剂盒购自南京生航生物技术有限公司。乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯，购自上海安谱实验科技股份有限公司。

1.3 仪器 Agilent 1290 超高效液相色谱仪、Agilent 6545 四极杆飞行时间质谱仪（美国安捷伦公司）；Milli-Q 超纯水系统（美国 Millipore 公司）。

2 方法

2.1 造模和粪便样本收集 大鼠适应性饲养 7 d 后，按体重质量随机分为正常组和胃炎组，每组 6 只，胃炎组造模周期为 4 周，造模前禁食不禁水 12 h，灌胃给药前 1 h 撤去水源，灌胃给予 56% 乙醇（给药质量浓度为 8 g/kg）诱导慢性胃炎的发生，正常组灌胃给予等体积生理盐水，每 3 d 1 次。造模第 28 天结束 12 h 后，用无菌管收集正常、胃炎大鼠粪便，麻醉后取胃组织，冰生理盐水洗去胃内容物后 4% 多聚甲醛固定 36 h，梯度乙醇脱水，透明，石蜡包埋，切片（5 μm ），脱蜡，进行 HE 染色，倒置显微镜下观察胃组织病理变化。另取新鲜大鼠胃组织，按照胃蛋白酶活性检测试剂盒使用说明书检测胃蛋白酶活性。

2.2 胃康灵胶囊肠道菌孵育

2.2.1 肠道菌液配制 厌氧培养基（GAM）的配制方法参考文献 [11-12] 报道，选取 6 个健康志愿者，女性 4 例，男性 2 例，采样前 3 个月内未服用任何抗生素或益生菌制剂，粪便收集前均经本人确认自愿参加并签署知情同意书，本研究经上海交通大学 Bio-X 中心伦理委员会批准（批准号 ML18013）。将收集的新鲜粪便混合，匀质化后在厌氧条件下与 GAM（1 g : 25 mL）混合，充分涡旋混合后 3 层纱布过滤，所得滤液即为人肠道菌液。取“2.1”项下大鼠粪便，按照人肠道菌液制备方法制备正常/胃炎大鼠肠道菌液。

2.2.2 胃康灵胶囊在人源肠道菌液中孵育 健康人每天正常粪便量为 100~300 g（平均 200 g），拟定胃康灵胶囊与人粪便比例为 4.8 g : 200 g，胃康灵胶囊与人源肠道菌液比例为 4.8 g : 5 000 mL。取胃康灵胶囊粉末 48 mg，加入 50 mL 人源肠道菌液，混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧条件下孵育，分别于 0、1、3、6、12、24、48 h 取样 1 mL，立即用 1.5 倍量水饱和正丁醇萃取 3 次，萃取液 37 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干，1.0 mL 70% 甲醇复溶，10 000 r/min 离心 10 min，即得。取同体积人源肠道菌液单独孵育，制备空白样品。

2.2.3 胃康灵胶囊在鼠源肠道菌液中孵育 以成年男性体质量 70 kg、大鼠体质量 200 g，设定胃康灵胶囊剂量为每天 4.8 g，按照等效剂量折算，大鼠剂量为每天 0.086 4 g。雄性大鼠每日大便量为 4~11 g（平均 7.5 g），因此拟定胃康灵胶囊与大鼠粪便比例为 0.086 4 g : 7.5 g，即胃康灵胶囊粉末与人源肠道菌液比例为 86.4 mg : 193 mL。取胃康灵胶囊粉末 22.4 mg，加入 50 mL 正常、胃炎大鼠肠道菌液，混匀，按“2.2.2”项下方法操作。取同体积大鼠肠道菌液单独孵育，制备空白样品。

2.3 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

2.3.1 溶液制备

2.3.1.1 供试品溶液 参考文献 [2] 报道，精密称取胃康灵胶囊粉末 1.0 g，70% 甲醇溶解，超声提取 2 次，每次 30 min（15、10 mL），3 000 r/min 离心 10 min，将上清液转移至 25 mL 量瓶中，定容，即得质量浓度为 40 mg/mL 的供试品溶液。

2.3.1.2 对照品溶液 取甘草苷、异甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、异甘草素、甘草素、芒柄花素、甘草酸、甘草次酸、芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、militarine、dactylorhin A 对照品适量，置于量瓶中，70% 甲醇溶解，定容，得质量浓度为 1 mL/mg 的储备液，使用时稀释至 50~200 ng/mL，即得。

2.3.2 条件 参考文献 [2] 报道。

2.3.2.1 色谱 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱（2.1 mm \times 100 mm，1.8 μm ）；流动相 0.1% 甲酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~8 min，10%~11% B；8~14 min，11%~21% B；14~20 min，21%~27% B；20~24 min，27%~38% B；24~31 min，38%~53.5% B；31~38 min，53.5%~90% B；38~40 min，90%~10% B）；体积流量 0.4 mL/min；柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 2 μL 。

2.3.2.2 质谱 电喷雾离子源（ESI），负离子模式；MS 扫描范围 m/z 100~1 700，MS/MS 扫描范围 m/z 100~1 700；毛细管电压 3 500 V；干燥气、保护气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ ；干燥气体积流量 8 L/min；碰撞电压 150 V；碰撞能量 5、20、35、50 eV；雾化器压力 50 psi（1 psi=6.895 kPa）。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 24.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，2 组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 胃康灵胶囊在人源肠道菌液中代谢分析 胃康灵胶囊在人源肠道菌液中孵育不同时间的 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 基峰色谱图见图 1。结果显示，人源肠道菌液的基质效应明显强于未经孵育的胃康灵胶囊化学成分的质谱响应；两者混合共孵育 0、1、6、48 h 后，其干扰更显著。因此，后续采用提取离子和对照品比对的方式对胃康灵胶囊在人源肠道菌液中的原型成分进行定性鉴别。

3.1.1 胃康灵胶囊在人源肠道菌液中代谢速率分析 胃康灵胶囊与人源肠道菌液共孵育 0、1、6、48 h 的提取离子色谱图见图 2，共有 15 种原型成分可被检测到，随着孵育时间延长，糖苷类成分相对含量降低，苷元类成分相对含量升高。15 种原型成分在人肠道菌液中的剩余量随时间变化曲线见图 3，可知芍药苷在 12 h 内即可被完全代谢，氧化芍药苷在 48 h 内被完全代谢，而芍药内酯苷在 48 h 后仍有 16% 的剩余（图 3A），这 3 种成分是胃康灵胶囊中的单萜苷类成分；甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、异甘草苷在 3 h 内即可被完全代谢（图 3B），它们是胃康灵胶囊中的黄酮苷类成分；甘草素、异甘草素、芒柄花素是胃康灵胶囊中的黄酮苷元类成分，在与肠道菌液

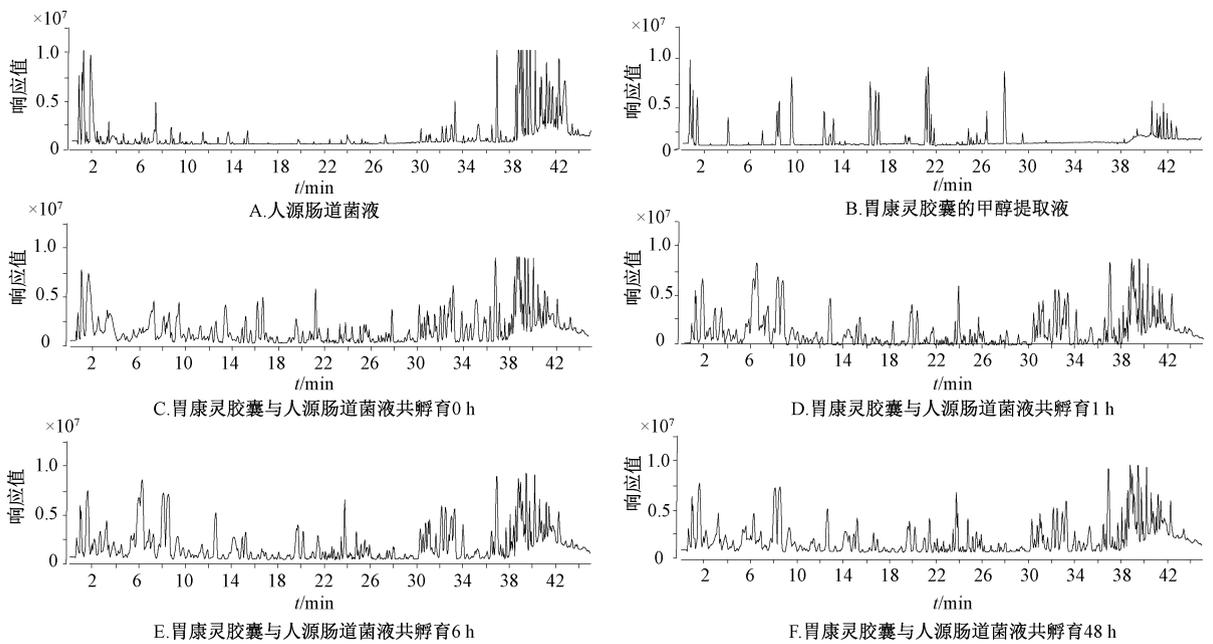
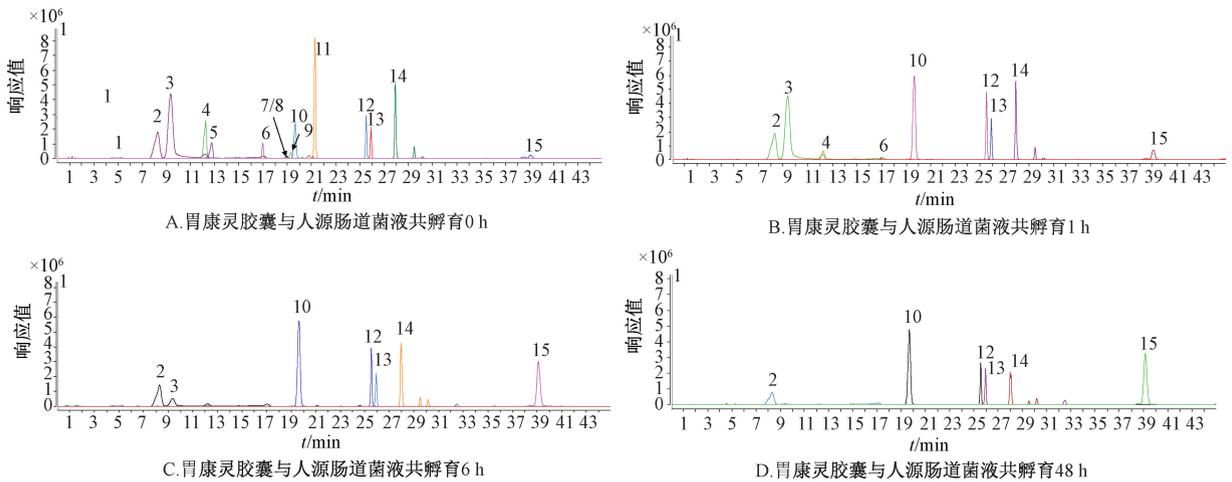


图1 胃康灵胶囊在人源肠道菌液中孵育不同时间的UHPLC-Q-TOF-MS/MS基峰色谱图



1. 氧化芍药苷 2. 芍药内酯苷 3. 芍药苷 4. 甘草苷 5. 蔗糖异甘草苷 6. dactylorhin A 7. 蔗糖异甘草苷 8. 芒柄花苷 9. 异甘草苷 10. 甘草素 11. militarine 12. 异甘草素 13. 芒柄花素 14. 甘草酸 15. 甘草次酸

图2 胃康灵胶囊中15种化学成分与人源肠道菌液共孵育0、1、6、48 h的提取离子色谱图

共孵育1 h后出现急剧增加的现象,随后会被继续代谢减少(图3C),可能是肠道菌液与黄酮苷和苷元共孵育时,脱糖反应快于重排、加氢等反应造成的;dactylorhin A和militarine是胃康灵胶囊中的小分子酸苷类成分,在3 h内即可被代谢完全(图3D);三萜类成分甘草酸在48 h可被代谢67%(图3E);相应的甘草次酸成分在6 h含量达到平台期,6~48 h几乎不变(图3F)。

3.1.2 胃康灵胶囊在人源肠道菌液中代谢产物分析 建立15种原型成分的代谢产物库,包括水解、重排、氢化、裂解、去甲基化等反应,使用Agilent Qualitative Workflows软件进行匹配,共鉴别24种代谢产物,见表1。**M4**、**M2**的保留时间分别为5.63、3.95 min,准分子离子峰分别为 m/z 167.035 7、183.025 8,其碎片离子分别为 m/z 121.029 5、

137.024 6,与文献[13]报道一致,推测该化合物为苯甲酸和4-羟基苯甲酸,是芍药中单萜苷类成分的主要取代基。**M6**的保留时间为8.37 min,准分子离子峰 m/z 为525.161 4 [$M-H+HCOOH$]⁻、479.156 0 [$M-H$]⁻,脱去葡萄糖分子形成碎片离子峰 m/z 317.102 7,脱去苯甲酰基 m/z 121.029 4,被离子源轰击重排后得到碎片离子 m/z 357.120 0、283.082 7,与对照品和文献[13]报道一致,推测该化合物为芍药内酯苷,其二级质谱图及裂解途径见图4A。**M21**的保留时间为25.27 min,准分子离子峰为 m/z 257.081 9 [$M-H$]⁻,离子源轰击后,酰基两侧C-C键发生断裂,重排后可产生碎片离子 m/z 151.039 6、109.092 8、135.008 3、122.037 1,与文献[14-15]报道一致,推测该化合物为达维萜苷元,其二级质谱图及裂解途径见图4B。**M12**的

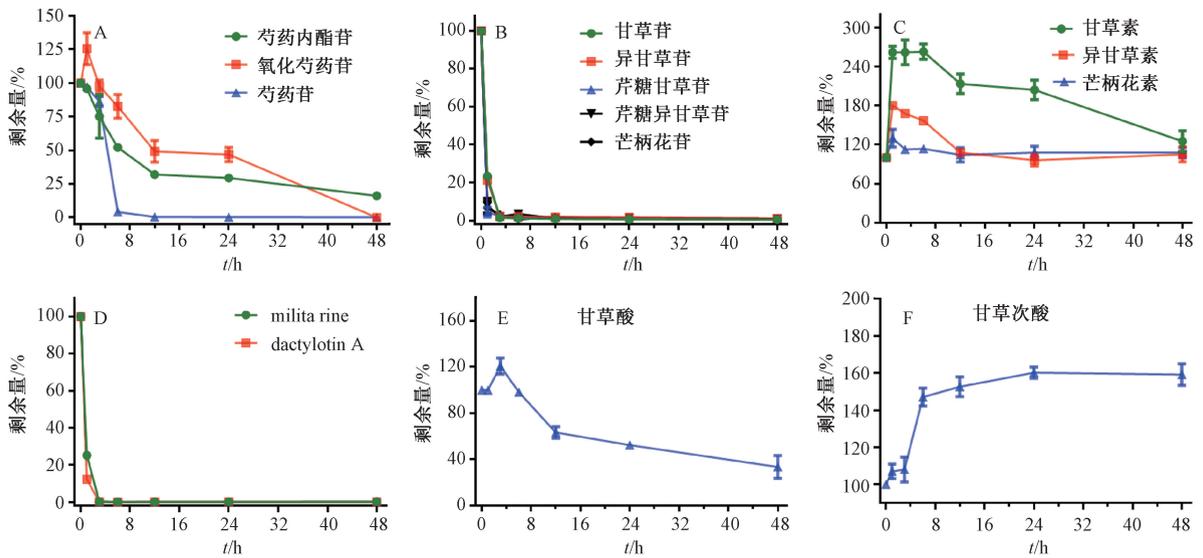


图3 胃康灵胶囊中15种化学成分在人源肠道菌液中的转化剩余量与时间变化曲线

保留时间为16.29 min, 准分子离子峰为 m/z 457.172 3 [M-H]⁻, 在负离子模式下可产生碎片离子 m/z 285.097 9、189.076 1、123.044 5, 与文献 [16] 报道一致, 推测该化

合物为手参苷 I, 其二级质谱图及裂解途径见图 4C。另外, 其他代谢产物均是采用文献对比或对照品比对的方法进行鉴别。

表1 胃康灵胶囊在人源肠道菌液中代谢产物

编号	t_R /min	分子式	离子模式	分子离子峰 m/z			MS/MS 碎片离子	名称	类型
				理论值	实测值				
M1	1.62	C ₆ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	125.024 4	125.024 7	125.024 7		1,2,4-三羟基苯	酚酸类
M2	3.95	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H+HCOOH] ⁻	183.029 9	183.025 8	137.024 6		4-羟基苯甲酸	酚酸类
M3	5.33	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	495.150 8	495.151 8	495.151 8		4''-hydroxyalbiflorin	单萜类
M4	5.63	C ₇ H ₆ O ₂	[M-H+HCOOH] ⁻	167.035 0	167.035 7	121.029 5		苯甲酸	酚酸类
M5	7.25	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	[M-H+HCOOH] ⁻	363.108 5	363.111 3	317.097 1		苯甲酰芍药内酯苷元	单萜类
M6	8.37	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	[M-H+HCOOH] ⁻	525.161 4	525.161 4	479.156 0, 357.120 0, 317.102 7, 283.082 7, 121.029 4		芍药内酯苷*	单萜类
M7	8.52	C ₇ H ₈ O ₂	[M-H+HCOOH] ⁻	169.050 6	169.046 9	123.045 6		对羟基苯甲醇	酚酸类
M8	9.43	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	165.055 7	165.055 5	147.044 8, 121.065 8, 119.050 0, 106.042 0		4-羟基苯丙酸	酚酸类
M9	9.48	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	[M-H+HCOOH] ⁻	241.071 8	241.071 4	195.066 5		芍药内酯 B	单萜类
M10	12.22	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.119 1	417.118 8	255.066 7, 135.009 2		甘草苷*	黄酮类
M11	12.23	C ₈ H ₁₃ O ₅	[M-H+HCOOH] ⁻	234.074 5	234.080 4	188.070 3		α-isobutyramic acid	有机酸
M12	16.29	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	457.171 5	457.172 3	285.097 9, 189.076 1, 153.054 8, 123.044 5		手参苷 I	酚酸类
M13	16.33	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	[M-H+HCOOH] ⁻	243.087 4	243.081 3	197.081 9		芍药内酯 A	单萜类
M14	19.08	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H+HCOOH] ⁻	299.056 1	299.053 3	253.053 3		isoaurostatin	黄酮类
M15	19.28	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.119 1	417.119 4	255.066 6, 135.009 2, 119.050 2		异甘草苷*	黄酮类
M16	19.38	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	375.129 7	375.126 3	210.077 8, 171.065 9		脱苯甲酰基芍药内酯苷	单萜类
M17	19.58	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.066 3	255.066 6	135.009 2, 119.050 2		甘草素*	黄酮类
M18	19.63	C ₁₇ H ₁₈ O ₇	[M-H+HCOOH] ⁻	379.103 5	379.101 5	334.105 3		4-hydroxybenzoyl albiflorin glycogen	单萜类
M19	21.31	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₇	[M-H] ⁻	725.266 2	725.269 1	457.174 8		militarine*	酚酸类
M20	23.54	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	[M-H] ⁻	285.098 0	285.097 1	285.097 1		天麻素	酚酸类
M21	25.27	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	257.081 9	257.081 9	163.039 4, 151.039 6, 135.008 3, 122.037 1, 109.092 8, 107.049 6		达维英莲苷元	黄酮类
M22	25.47	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.066 3	255.066 9	135.009 2, 119.050 2		异甘草素*	黄酮类
M23	25.88	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	267.066 3	267.066 2	252.043 3, 223.040 1, 195.044 8, 132.021 3		芒柄花素*	黄酮类
M24	39.08	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	[M-H] ⁻	469.332 3	469.332 8	425.341 9, 355.266 4		甘草次酸*	三萜类

注: * 为通过对照品进行鉴别。

3.1.3 胃康灵胶囊在人源肠道菌液中代谢途径分析 胃康灵胶囊中的糖苷类成分在离体人源肠道菌液中的主要代谢途径为脱糖基, 单萜类和黄酮类还会发生重排、开环、

加氢和脱甲基等反应, 结合相关文献分析, 推测人源肠道菌液中代谢产物的典型代谢途径, 见图 5。由此可知, 芍药苷的 2 个 C-O 键不稳定, 断裂并内酯化生成芍药内酯苷

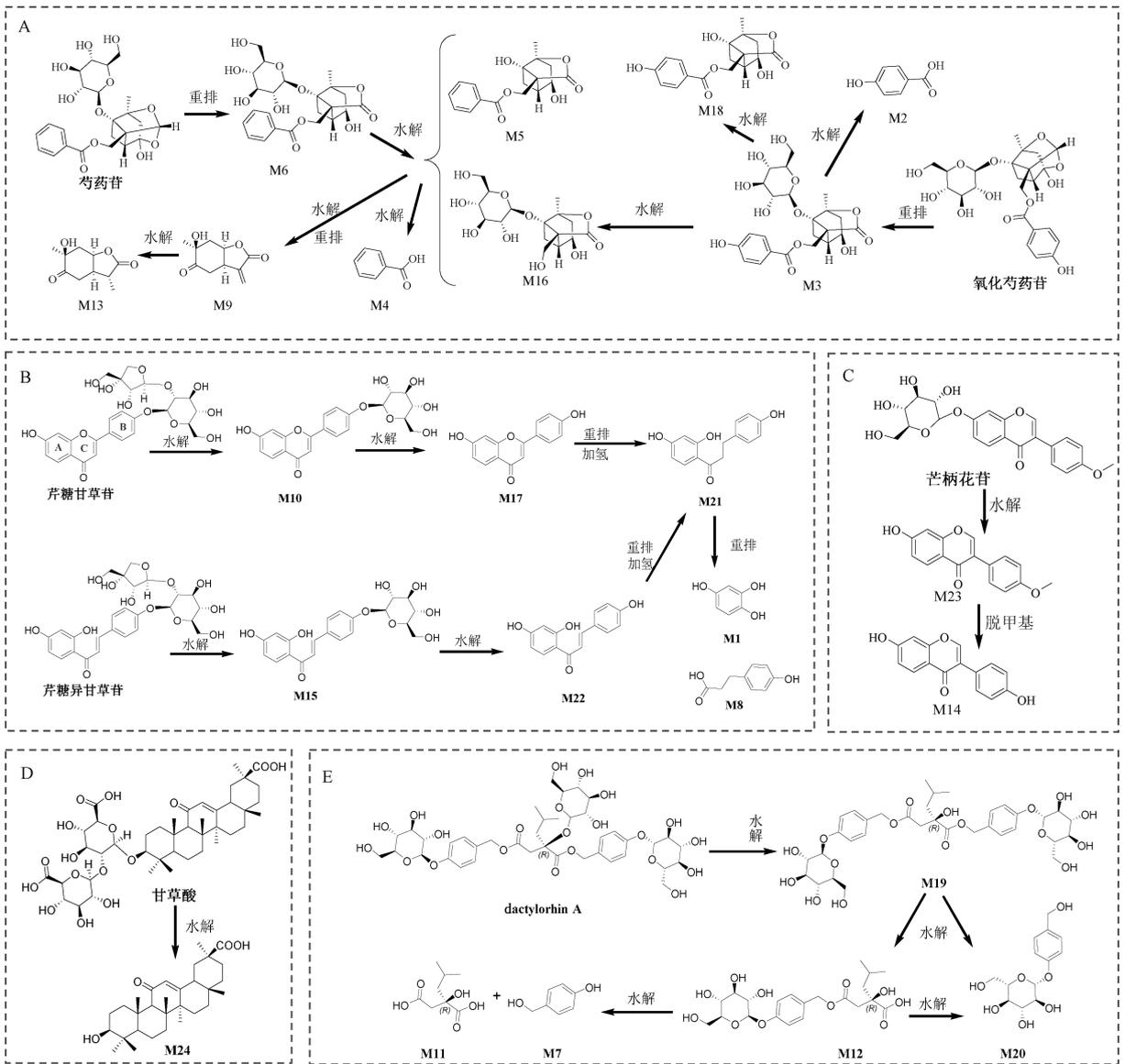


图5 人肠道菌液中胃康灵胶囊代表性成分的代谢途径

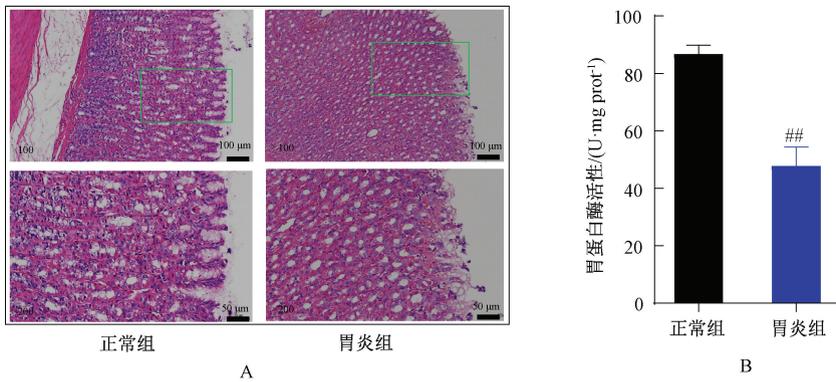


图6 胃炎大鼠模型塑造及评价 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

道菌液中；此外，胃炎大鼠肠道菌液孵育 12 h 后，异甘草素几乎完全代谢，推测胃炎大鼠肠道菌组成可能发生了变化，加速了异甘草素的转化。芒柄花素在 3 种肠道菌液的

代谢行为与异甘草素类似。单萜苷类成分相比于黄酮苷类成分，其代谢速度较为缓慢。孵育 48 h 后，氧化芍药苷在 3 种肠道菌液中可被完全代谢，其代谢速率表现为正常大

鼠>人、正常大鼠>胃炎大鼠；芍药内酯苷的剩余量在正常 谢速率表现为正常大鼠>胃炎大鼠，此外，在0~6 h，代谢
大鼠为32%，胃炎大鼠为44%，人为16%，在0~48 h，代 速率表现为正常大鼠>人，6~48 h代谢速率表现为人>正常

表2 胃康灵胶囊15种原型成分在不同来源肠道菌液中孵育不同时间的相对剩余量 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

名称	t/min	组别	相对剩余量/%					
			1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
氧化芍药苷	5.27	人	125.5±11.9	97.7±4.4	82.7±8.9	49.2±8.0	46.9±5.3	—
		正常大鼠	85.9±2.5**	65.7±10.5**	38.7±12.8**	29.3±11.8	28.6±1.3**	—
		胃炎大鼠	110.3±15.4	130.7±2.7##	82.6±0.1##	47.8±8.4	—	—
芍药内酯苷	8.37	人	95.8±0.9	75.2±16.2	52.2±0.4	32.0±1.0	29.4±0.3	16.1±1.3
		正常大鼠	88.1±3.7*	57.3±13.4	48.2±3.2	40.0±2.3**	37.5±1.4**	32.1±9.0*
		胃炎大鼠	101.6±5.2#	103.0±3.4##	98.6±1.6##	86.6±1.1##	60.5±1.0##	44.8±1.6
芍药苷	9.43	人	97.3±1.3	86.2±3.8	4.1±0.02	0.3±0.01	0.2±0.03	0.1±0.02
		正常大鼠	93.0±5.1	79.8±2.2	71.0±0.9**	41.8±3.2**	32.1±0.6**	15.9±1.1**
		胃炎大鼠	102.9±5.6	102.6±4.2##	104.3±2.4##	73.8±5.6##	16.8±1.9##	3.6±2.9##
甘草苷	12.22	人	23.4±1.9	1.4±0.0	1.1±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1	0.4±0.0
		正常大鼠	18.7±2.5	2.6±0.4**	1.6±0.0**	1.6±0.0**	1.3±0.2**	1.4±0.2**
		胃炎大鼠	4.9±4.1##	2.1±0.7	1.3±1.3	1.3±1.0	1.3±0.7	1.4±0.6
芹糖甘草苷	12.73	人	4.4±2.6	2.3±0.3	2.0±0.4	1.5±0.4	1.2±0.3	0.9±0.1
		正常大鼠	13.3±0.5**	4.0±0.6*	4.5±0.8**	4.3±0.9**	4.3±1.7*	4.5±0.9**
		胃炎大鼠	2.9±2.6##	1.7±0.7#	2.0±1.0#	2.0±0.5#	2.8±1.3	2.6±1.4
dactylorhin A	17.05	人	12.2±1.2	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
		正常大鼠	3.5±0.9**	1.5±0.7*	1.1±0.1**	2.1±1.6	1.2±1.1	1.1±0.1
		胃炎大鼠	2.0±1.7	2.1±1.8	2.0±0.0##	0.6±0.2	1.8±0.5	1.1±0.7
芹糖异甘草苷	18.97	人	7.8±3.9	2.0±0.5	3.4±1.8	1.1±0.3	1.3±1.0	1.0±0.4
		正常大鼠	16.0±3.0*	11.4±1.2**	11.4±6.3	8.3±0.5**	9.3±2.3**	6.3±0.3**
		胃炎大鼠	3.5±2.8##	1.4±0.5##	2.2±0.7	2.3±0.2##	1.1±0.3##	2.5±1.1##
芒柄花苷	19.02	人	6.6±3.4	3.1±1.0	0.6±0.5	1.7±0.9	0.7±0.4	1.0±0.1
		正常大鼠	42.7±6.3**	22.5±6.9**	18.0±4.6**	24.1±6.6**	11.7±1.3**	11.9±1.5**
		胃炎大鼠	7.5±6.2##	2.6±1.2##	4.5±1.8##	6.6±3.4#	5.1±2.8#	5.1±1.5#
异甘草苷	19.27	人	21.2±0.3	2.2±0.7	2.0±0.3	1.8±0.2	1.6±0.2	1.0±0.3
		正常大鼠	28.5±8.8	8.8±2.5*	3.0±1.1	5.4±0.8**	10.1±11.1	6.3±0.3**
		胃炎大鼠	4.1±0.3##	0.6±0.3##	0.6±0.3#	0.7±0.4##	0.5±0.1	0.4±0.2##
甘草素	19.58	人	261.6±9.4	261.8±19.1	262.9±11.9	213.4±15.1	204.2±15.0	125.2±16.2
		正常大鼠	202.7±10.6**	197.6±11.8**	196.7±8.1**	208.6±5.8	207.0±13.9	206.0±13.8**
		胃炎大鼠	149.7±5.7##	141.2±5.2##	131.2±7.5##	119.4±3.4##	117.3±5.2##	121.1±7.0##
militarine	21.31	人	25.2±1.6	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.2
		正常大鼠	3.4±0.6**	0.7±0.1**	0.7±0.1**	0.5±0.2*	0.7±0.2*	0.7±0.2*
		胃炎大鼠	4.5±5.6	2.9±3.5	5.5±8.2	2.4±2.6	2.1±2.6	2.4±3.0
异甘草素	25.46	人	180.0±3.2	167.9±5.2	157.0±6.1	107.8±0.3	96.2±8.8	105.2±11.5
		正常大鼠	99.1±11.3**	101.4±10.9**	98.4±4.1**	105.8±5.1	97.7±7.3	89.0±5.3
		胃炎大鼠	99.8±4.1	49.6±2.3##	24.0±4.0##	15.7±0.3##	14.7±0.9##	10.2±1.2##
芒柄花素	25.92	人	130.1±13.6	112.6±5.2	113.6±3.4	104.3±11.0	107.8±9.7	107.9±7.9
		正常大鼠	75.5±3.8**	72.9±0.2**	72.1±0.8**	75.5±3.8**	74.9±2.0**	68.2±5.5**
		胃炎大鼠	91.2±6.9#	50.4±2.1##	30.5±0.9##	28.8±0.8##	28.8±1.3##	30.1±1.8##
甘草酸	27.90	人	99.8±1.1	120.6±7.0	98.1±2.3	63.2±4.9	52.2±0.3	33.4±9.9
		正常大鼠	64.6±3.3**	26.6±6.9**	31.7±2.4**	30.5±1.2**	30.1±1.3**	20.5±1.6
		胃炎大鼠	36.9±0.2##	28.0±0.6	33.6±12.5	28.3±9.1	29.9±15.0	22.5±8.4
甘草次酸	39.06	人	107.0±4.0	108.1±6.8	147.1±4.9	152.7±5.3	160.2±3.0	159.2±5.8
		正常大鼠	133.7±5.5**	143.4±13.8*	156.4±13.0	144.4±16.0	154.9±11.8	134.1±4.6**
		胃炎大鼠	114.5±9.6#	124.7±8.0	130.4±13.1	132.3±15.1	127.5±14.2	127.8±10.9

注：与人肠道菌液比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与正常大鼠肠道菌液比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

大鼠；芍药苷的剩余量在正常大鼠为16%，胃炎大鼠约为 常大鼠，正常大鼠>胃炎大鼠，在3~12 h，代谢速率表现
4%，人几乎完全代谢，在0~3 h，代谢速率表现为人≈正 为人>正常大鼠>胃炎大鼠，在12~48 h，代谢速率表现为

人>胃炎大鼠>正常大鼠。dactylorhin A 和 militarine 在 1 h 内几乎被肠道菌液完全代谢,在快速代谢期内代谢速率表现为胃炎大鼠>正常大鼠>人;甘草酸在正常大鼠肠道菌液和胃炎大鼠肠道菌液中代谢速率基本一致,均大于在人肠道菌液中的代谢速率。甘草次酸在肠道菌液中代谢速率表现为人>正常大鼠,胃炎大鼠>正常大鼠。

4 讨论

课题组前期以芍药苷、甘草苷、militarine、人参皂苷(Rb1、Re、Rg1)和三七皂苷 R1 为对照品,建立白芍、甘草、白及和三七药材的“一板多药味”薄层色谱鉴别方法^[24];以芍药内酯苷、芍药苷、甘草酸、dactylorhin A 和 militarine 为对照品,建立多成分含量测定评价方法^[2]。然而,上述成分是否是药效成分有待确认。

依据胃康灵胶囊口服后的胃肠道代谢顺序,本研究首先探索人工胃液和人工肠液对胃康灵胶囊中主要化学成分的影响,证明其未发生明显变化,在此基础上深入探究胃康灵胶囊在人肠道菌液中的代谢变化。胃康灵胶囊中黄酮苷(甘草苷、异甘草苷、芹糖甘草苷、异芹糖甘草苷和芒柄花苷)与人肠道菌液孵育 1 h 即可被代谢 90% 以上,其相应的苷元含量(甘草素、异甘草素、芒柄花素)与人肠道菌液孵育 1 h 达到顶峰,说明胃康灵胶囊中黄酮苷在肠道菌水解酶作用下可快速转变为相应的苷元,同时预示着黄酮苷及其苷元在体内达峰时间极可能出现在 1 h 以内,与文献报道一致^[25]。dactylorhin A 和 militarine 在肠道菌液中同样被快速代谢,体内达峰时间可能与黄酮苷类似。单萜苷(芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷)在人肠道菌液的代谢相对缓慢,代谢 3 h 后含量才会快速下降,说明胃康灵胶囊中单萜苷成分在体内的吸收代谢相对缓慢,而文献报道的单萜苷成分达峰时间在 1 h 内^[26],推测单萜苷成分受到其他成分的相互作用,其体内过程发生了变化。甘草酸在人肠道菌液的代谢同样相对缓慢,代谢 48 h 后仍然有 33% 的剩余量,其代谢产物甘草次酸在 6~48 h 的含量基本趋于平衡,说明肠道菌液不能继续代谢甘草次酸,推测甘草次酸在体内的达峰时间应该出现在 6 h 之后。上述结果证实,本课题组前期用于质量控制的化学成分是潜在的药效成分^[2,24],然而这些成分的体内药代动力学行为有待实验验证。同时,在快速代谢期比较胃康灵胶囊在人与正常大鼠的代谢情况发现,两者的代谢产物无差异,在代谢速率上,黄酮苷类成分和甘草次酸的代谢速率表现为人>正常大鼠,其他成分的代谢速率表现为正常大鼠>人,这说明使用大鼠进行胃康灵胶囊体内药效物质分析科学可行。同样,比较它们在正常大鼠与模型大鼠的代谢情况发现,单萜苷类成分的代谢速率主要表现为正常大鼠>模型大鼠,其他成分均表现为模型大鼠>正常大鼠,这说明在病理状态下,大鼠对药效成分的吸收速度存在差异,而这种差异需要进一步体内验证。

综上所述,胃康灵胶囊与人源和鼠源肠道菌液共孵育的体外代谢研究为其体内代谢考察奠定了基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1270-1271.
- [2] Liu F, Ding H R, Wang M Y, et al. A multi-evaluating strategy for Weikangling Capsules: chemical profiling, fingerprinting combined with quantitative analysis, quantity transfer, and dissolution curve [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2021, 206: 114347.
- [3] Wang R F, Yuan M, Yang X B, et al. Intestinal bacterial transformation-a nonnegligible part of Chinese medicine research [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(5): 532-549.
- [4] Zhang F, He F, Li L, et al. Bioavailability based on the gut microbiota: a new perspective [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2020, 84(2): e72-e119.
- [5] Nazari S, Rameshrad M, Hosseinzadeh H. Toxicological Effects of *Glycyrrhiza glabra* (Licorice): a review [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(11): 1635-1650.
- [6] Yamamura Y, Kawakami J, Santa T, et al. Pharmacokinetic profile of glycyrrhizin in healthy volunteers by a new high-performance liquid chromatographic method [J]. *J Pharm Sci*, 1992, 81(10): 1042-1046.
- [7] Nose M, Ito M, Kamimura K, et al. A comparison of the antihepatotoxic activity between glycyrrhizin and glycyrrhetic acid [J]. *Planta Med*, 1994, 60(2): 136-139.
- [8] 李鑫, 王文艳. 酯酶的药物代谢与种属差异研究进展 [J]. *药学进展*, 2021, 45(10): 784-792.
- [9] 许智颖, 黄芳, 方悦. 影响口服药物吸收的因素探讨 [J]. *海峡药学*, 2016, 28(6): 248-249.
- [10] Grundy D. Principles and standards for reporting animal experiments in the journal of physiology and experimental physiology [J]. *Exp Physiol*, 2015, 100(7): 755-758.
- [11] Zhou G S, Peng Y, Zhao L J, et al. Biotransformation of total saponins in *Siraitia Fructus* by human intestinal microbiota of normal and type 2 diabetic patients: comprehensive metabolite identification and metabolic profile elucidation using LC-Q-TOF/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(8): 1518-1524.
- [12] Li Y, Peng Y, Wang M Y, et al. Human gastrointestinal metabolism of the *Cistanches Herba* water extract *in vitro*: elucidation of the metabolic profile based on comprehensive metabolite identification in gastric juice, intestinal juice, human intestinal bacteria, and intestinal microsomes [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(34): 7447-7456.
- [13] Shi Y H, Zhu S, Ge Y W, et al. Characterization and quantification of monoterpenoids in different types of peony root and the related *Paeonia* species by liquid chromatography coupled with ion trap and time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 129: 581-592.
- [14] Zhang L, Zhao H Y, Liu Y, et al. Metabolic routes along digestive system of licorice: multicomponent sequential metabolism method in rat [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(6): 902-912.

- [15] Xu T T, Yang M, Li Y F, et al. An integrated exact mass spectrometric strategy for comprehensive and rapid characterization of phenolic compounds in licorice [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(21): 2297-2309.
- [16] Yang C, Xia T, Wang C Q, et al. Using the UPLC-ESI-Q-TO-MS^E method and intestinal bacteria for metabolite identification in the nonpolysaccharide fraction from *Bletilla striata*[J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(11): e4637.
- [17] Hattori M, Shu Y, Kobashi K, et al. Metabolism of albiflorin by human intestinal bacteria [J]. *Wakan Iyaku Gakkaishi*, 1985, 2(2): 398-404.
- [18] 柯仲成, 杨楠, 侯雪峰, 等. 大鼠肠道菌群对芍药苷体外代谢转化的研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(20): 3839-3845.
- [19] 刘鑫鑫. 芍药苷和芍药内酯苷的代谢研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2009.
- [20] 于航, 郑瑞芳, 苏文灵, 等. 基于肠道菌的黄酮类成分代谢特征及药理学思考[J]. *药学学报*, 2021, 56(7): 1757-1768; 1748.
- [21] Zhang M, Peng Y, Wang M Y, et al. The influence of compatibility of Si-Ni decoction with metabolism in intestinal bacteria on transports of toxic diterpenoid alkaloids from processed aconite root across Caco-2 monolayers [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228: 164-178.
- [22] Huang W W, Wang M Y, Shi H M, et al. Comparative study of bioactive constituents in crude and processed *Glycyrrhizae radix* and their respective metabolic profiles in gastrointestinal tract *in vitro* by HPLC-DAD and HPLC-ESI/MS analyses [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(11): 1945-1952.
- [23] Kim M, Lee J, Han J. Deglycosylation of isoflavone C-glycosides by newly isolated human intestinal bacteria[J]. *J Sci Food Agric*, 2015, 95(9): 1925-1931.
- [24] Liu F, Wang M Y, Li X B. Simultaneous qualitative characterization of four herbs in Weikangling capsules by a validated high-performance thin-layer chromatography method [J]. *J Planar Chromat*, 2020, 33(5): 449-455.
- [25] Lu Y Y, Chen J F, Song J Y, et al. Pharmacokinetics study of 16 representative components from Baoyuan Decoction in rat plasma by LC-MS/MS with a large-volume direct injection method[J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 148-157.
- [26] 胡延喜. 赤芍总苷在大鼠体内药代动力学和芍药苷与血清白蛋白相互作用研究[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2018.

桑葚中性多糖结构及其对D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用

刘富饶¹, 郭子萌², 任婷¹, 李波², 吴巍¹, 李慧¹, 焦丽丽^{1*}

(1. 长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117)

摘要: 目的 探究桑葚中性多糖的结构特征及其对D-半乳糖致衰老小鼠的保护作用。方法 采用水提醇沉法提取桑葚多糖, DEAE-纤维素柱和 Sepharose CL-6B 色谱柱纯化, 获得中性多糖。采用高效液相色谱 (HPLC) 和红外光谱 (FT-IR) 法对中性多糖的分子质量、单糖组成及特征官能团进行分析。通过腹腔注射 D-半乳糖建立过氧化损伤小鼠模型, 灌胃给予中性多糖 (50、100、200 mg/kg), 检测小鼠血清和肝组织 SOD、T-AOC、CAT、GSH-Px 活性及 MDA 水平。结果 桑葚中性多糖纯度为 76.18%, 分子量为 1.068×10^4 Da, 主要由葡萄糖 (76.9%)、半乳糖 (6.0%)、阿拉伯糖 (17.1%) 组成, 可提高小鼠血清和肝组织 SOD、GSH-Px、CAT、T-AOC 酶活性, 减少 MDA 水平。结论 桑葚中性多糖能有效改善 D-半乳糖诱导的氧化损伤, 从而起到抗衰老作用。

关键词: 桑葚中性多糖; 结构; D-半乳糖; 衰老; 抗氧化

中图分类号: R284.1; R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)01-0246-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.01.042

收稿日期: 2022-04-15

基金项目: 中央引导地方科技发展基金项目 (202002051JC)

作者简介: 刘富饶 (1998—), 女, 硕士生, 从事糖生物化学研究。Tel: 15948021665, E-mail: 1004015869@qq.com

* 通信作者: 焦丽丽 (1982—), 女, 研究员, 博士生导师, 从事糖生物化学研究。Tel: (0431) 87673991, E-mail: jianganjli@hotmail.com

网络出版日期: 2022-10-19

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20221018.1451.002.html>